

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.

● RISULTATI DI UNO STUDIO NEL 2008-2012 IN SICILIA OCCIDENTALE

In Sicilia il legno nero della vite deve essere monitorato

IN
breve

UN'INDAGINE EFFETTUATA in 37 aziende viticole, con varietà a diffusione sia nazionale sia locale in provincia di Agrigento, Palermo e Trapani, ha evidenziato: che la presenza di legno nero non mostra un andamento epidemico, in particolare nella cv Chardonnay, che si caratterizza per l'alta suscettibilità alla malattia; l'assenza di flavescenza dorata in tutti i vigneti in cui sono stati osservati sintomi da fitoplasmi. È comunque consigliabile non realizzare nuovi impianti nelle vicinanze di vigneti con varietà suscettibili a legno nero e già interessate dalla malattia. Tra le infestanti, il convolvolo (*C. arvensis*) rilevato nei vigneti infetti potrebbe rappresentare una sorgente del fitoplasma; diserbare e lavorazioni del terreno quindi sono consigliabili per diminuire i rischi di diffusione del legno nero.

di quanto avviene in seguito all'infezione del virus dell'accartocciamento fogliare della vite (GLRaV), interessano anche le nervature e spesso si manifestano in maniera settoriale sulla pagina fogliare (foto 3). I rami dell'anno tendono a non lignificare e, nel caso del legno nero, possono comparire pustole nerastre. Le infezioni precoci possono indurre il disseccamento del rachide con mancato sviluppo del grappolo, le infezioni tardive portano a una maturazione irregolare del grappolo causando, frequentemente, perdite qualitative sulla produzione.

Stessi sintomi ma cicli diversi per i due fitoplasmi

I due fitoplasmi, pur inducendo lo stesso tipo di sintomatologia, hanno cicli epidemiologici completamente diversi. **FD viene trasmesso in modo efficace dal cicadellide monofago *Scaphoideus titanus*** (foto 4), mentre **l'unico vettore attualmente accertato per la trasmissione su vite del fitoplasma stolbur è il cixiide polifago *Hyalesthes obsoletus*** (foto 5). L'efficienza di trasmissione di FD da parte dello *S. titanus* ne ha favorito la diffusione epidemica nelle aree in cui il vettore è insediato, corrispondenti agli areali viticoli dell'Italia settentrionale. L'esplosione di gravi epidemie ha portato a includere FD fra i patogeni da quarantena e all'emanazione in Italia di uno specifico decreto di lotta obbligatoria (dm 32442 del 31-5-2000) che, in alcuni areali viticoli, ha consentito il controllo della malattia tramite estirpazione di piante infette e lotta insetticida al vettore.

LN, per anni sottovalutato poiché considerato una malattia di minore rilevanza economica, è diffuso, invece, su tutto il territorio nazionale e negli ultimi anni si sono verificati gravi fenomeni di recrudescenza della malattia in molti areali viticoli (Belli et al., 2010). Il controllo del legno nero è molto più complesso rispetto a quello attuato per FD, soprattutto per la natura



Foto 1 Tipico accartocciamento a triangolo del lembo fogliare in pianta cv Chardonnay affetta da legno nero

di **L. Ferretti, G. Bono, A. Gentili, G. Pasquini**

I fitoplasmi sono patogeni sistemici responsabili su vite di una sindrome comunemente nota come **giallumi della vite (GY, Grapevine yellows)**. La sindrome comprende diverse malattie, di cui le più note sono: **la flavescenza dorata (FD), associata all'omonimo fitoplasma** (sottogruppi ribosomici 16SrV-C e D) **e il legno nero**

(LN), associato al fitoplasma stolbur (sottogruppo ribosomico 16SrXII-A). I due fitoplasmi non sono correlati tassonomicamente tra di loro, ma inducono lo stesso tipo di sintomatologia. Le piante infette presentano foglie arrotolate verso il basso fino ad assumere forma triangolare (foto 1), caratterizzate da una diffusa colorazione gialla nelle cultivar a uva bianca (foto 2A) e rossa nelle cultivar a uva nera (foto 2B). Le alterazioni di colore, a differenza

polifaga del vettore e la sua presenza occasionale su vite, che rende scarsamente efficaci i trattamenti insetticidi. Allo stesso tempo, l'eliminazione delle piante infette è una strategia attuabile solo in presenza di bassi livelli di infezione e, quindi, difficilmente proponibile nella maggior parte dei comprensori viticoli attualmente interessati dalla malattia.

Piante ospiti del fitoplasma stolbur e/o del vettore

Da un punto di vista epidemiologico, il ciclo del legno nero vede coinvolte, oltre alla vite e allo *H. obsoletus*, anche piante erbacee spontanee che fungono da ospiti dello stolbur e/o del vettore. L'**ortica** (*Urtica dioica*) e il **convolvolo** (*Convolvulus arvensis*) sono riconosciute fra le principali specie ospiti di *H. obsoletus*, che su di esse svolge gran parte del suo ciclo biologico. Infezioni di stolbur in queste specie spontanee sono state riscontrate in campioni provenienti da diversi areali viticoli, evidenziando un loro ruolo anche come serbatoio di inoculo del fitoplasma.

L'analisi molecolare eseguita su un gene variabile del fitoplasma stolbur (gene *tuf*) ha dimostrato l'esistenza di due ceppi denominati «tuf-tipo a» e «tuf-tipo b» associati, rispettivamente, all'ortica e al convolvolo, evidenziando il coinvolgimento di queste specie spontanee in due distinti cicli epidemiologici della malattia (Langer e Maixner, 2004). **Nel ciclo epidemiologico degli isolati di stolbur appartenenti al «tuf-tipo a» gli individui di *H. obsoletus* svolgono il loro ciclo vitale su piante di ortica, mentre nel caso degli isolati di stolbur «tuf-tipo b» l'insetto vettore compie il suo ciclo biologico su convolvolo.** I due tipi di isolati mostrano una distribuzione geografica definita (Pasquini et al., 2008) e sembrano



Foto 2 Alterazioni cromatiche del lembo fogliare in cultivar di vite a bacca bianca (A) e rossa (B). Questa sintomatologia è uguale sia per la flavescenza dorata sia per il legno nero



Foto 3 Arrossamenti settoriali del lembo fogliare e delle nervature in pianta di vite cv Nero d'Avola affetta da legno nero

avere anche una diversa patogenicità, in quanto il «tuf-tipo a» è stato spesso rinvenuto con maggiore frequenza in areali viticoli interessati da forme epidemiche della malattia.

In diverse regioni italiane numerose altre specie spontanee sono state trovate positive allo stolbur (Credi et al., 2006; Borgo et al., 2008; Romanazzi et al., 2009) e, per alcune di esse, è stata verificata anche la capacità di ospitare alcuni stadi di sviluppo di *H. obsoletus* (Milanesi et al., 2005), suggerendo un loro possibile coinvolgimento nel ciclo epidemiologico di LN.

Foto 4 Adulto di *Scaphoideus titanus* vettore della flavescenza dorata (4,5-6 mm)

Foto 5 Adulti di *Hyalesthes obsoletus* vettore del fitoplasma stolbur responsabile del legno nero (3,8-5,1 mm)



Nelle regioni dell'Italia meridionale i giallumi della vite sono stati finora associati alla sola presenza di legno nero, a eccezione della recente individuazione di un focolaio di FD sull'Isola di Ischia (Griffo et al., 2011). In tali regioni la malattia è diffusa in tutti gli areali viticoli ma, generalmente, è presente in forma endemica ed è associata alla sola presenza dell'isolato «tuf-tipo b» (Pasquini et al., 2008; Silletti et al., 2008).

Nonostante l'attuale diffusione di legno nero in Italia meridionale non desti particolare allarme, il monitoraggio dei giallumi della vite in questi territori è comunque necessario sia per tenere sotto controllo la diffusione della malattia, sia per identificare eventuali focolai di FD o nuovi insediamenti del rispettivo vettore, già presente in diverse regioni centro-meridionali (Viggiani, 2002 e 2004; Romanazzi et al., 2007; Bagnoli et al., 2008).

Il monitoraggio dei giallumi di fitoplasma

In Sicilia la presenza di giallumi della vite è stata segnalata per la prima volta su cv Inzolia agli inizi degli anni 80 (Granata, 1982 e 1985). Successivamente

Le indagini svolte con il monitoraggio

OSSERVAZIONI VISIVE

Complessivamente sono state monitorate 37 aziende viticole dotate di impianti commerciali realizzati con varietà a diffusione nazionale (Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Pinot nero, Pinot grigio, Syrah, Merlot) e/o varietà tipicamente locali (Catarratto bianco comune, Inzolia, Nerello mascalese, Nero d'Avola, Grecanico). Nella provincia di Trapani, il monitoraggio ha interessato anche due campi di portinnesti (*Vitis berlandieri* x *rupestris* 140 Ruggeri, 1103 Paulsen). (La localizzazione delle aziende monitorate e le varietà osservate sono elencate in tabella A consultabile in internet all'indirizzo riportato a fine articolo).

Nel corso dei sopralluoghi in campo, eseguiti nel periodo compreso tra fine estate e inizio autunno, in ciascuno dei vigneti monitorati si è proceduto al rilievo visivo di sintomi ascrivibili a giallumi da fitoplasmi e alla stima

della percentuale di piante sintomatiche presenti attraverso l'osservazione visiva dell'intero vigneto o di almeno il 25% circa delle piante presenti.

RACCOLTA CAMPIONI DI VITE E DI FLORA INFESTANTE

Contemporaneamente alle osservazioni visive, sono stati raccolti campioni di vite da piante con sintomi riferibili a GY e, limitatamente ad alcuni vigneti rappresentativi degli agroecosistemi considerati e dove la presenza di legno nero era stata precedentemente accertata, sono stati eseguiti un rilievo della flora spontanea e il prelievo di campioni dalle specie più rappresentate all'interno e/o lungo i bordi del vigneto.

Complessivamente sono stati prelevati e analizzati 79 campioni di vite, appartenenti a varietà sia locali sia a diffusione internazionale e 18 campioni di piante spontanee appartenenti alle specie *Convolvulus arvensis*, *Amaran-*

thus retroflexus e *Solanum nigrum*, risultate le specie generalmente più diffuse nei vigneti visitati.

IDENTIFICAZIONE DEL FITOPLASMA

I campioni vegetali raccolti sono stati analizzati molecularmente presso il Centro di ricerca per la patologia vegetale di Roma (Cra-Pav), sottoponendo il DNA estratto da ciascun campione a doppia amplificazione genica mediante tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) seguita da analisi RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Le analisi eseguite sono state finalizzate sia all'identificazione del fitoplasma associato ai sintomi osservati in campo, per escludere l'eventuale presenza di FD, sia alla determinazione del «tipo-tuf» di appartenenza degli isolati di stolbur rinvenuti nei campioni di vite e piante spontanee risultati infetti da questo fitoplasma. ●

te le attività di monitoraggio eseguite sul territorio hanno evidenziato la presenza di sintomi ascrivibili a giallumi da fitoplasmi anche su altre varietà, sia locali sia a diffusione nazionale, e le analisi molecolari eseguite sui campioni raccolti hanno consentito di attribuire tali giallumi alla sola presenza di stolbur «tuf-tipo b» (Pacífico et al., 2005; La Rosa et al., 2006 e 2008).

Nel periodo 2008-2012 il Servizio fitosanitario competente per il territorio ha effettuato estesi sopralluoghi in campo in aree viticole della Sicilia occidentale, situate nelle province di Agrigento, Palermo e Trapani volti ad accertare l'eventuale presenza di FD, in ottemperanza a quanto previsto dal dm 32442/2000 e a verificare l'andamento delle infezioni di legno nero già riscontrate in questi areali viticoli, anche alla luce dei recenti fenomeni di recrudescenza che questa malattia ha fatto registrare in particolare nell'Italia centro-settentrionale. Allo stesso tempo il monitoraggio è stato finalizzato ad approfondire alcuni aspetti del ciclo epidemiologico di legno nero nelle condizioni agroecologiche degli areali considerati. Il monitoraggio ha interessato sia vigneti realizzati con materiale di propagazione prodotto a livello regionale sia impianti costituiti con barbatelle di provenienza extraregionale, per poter effettuare una tracciatura dell'origine delle eventuali infezioni di

legno nero e, soprattutto, di FD. Inoltre, particolare attenzione è stata rivolta a vigneti realizzati con varietà autoctone poco indagate dal punto di vista dei giallumi da fitoplasmi.

Valutazione dei risultati

Sintomatologie ascrivibili ai giallumi della vite sono stati rilevati nella quasi totalità degli impianti monitorati. **Le analisi molecolari eseguite sui campioni raccolti hanno, comunque, evidenziato che i sintomi osservati erano sempre associati alla sola presenza del fitoplasma stolbur agente di LN, escludendo infezioni di FD in tutti i campioni sintomatici analizzati.**

Alterazioni caratteristiche, sia a livello delle foglie sia dei tralci, sono state rilevate su tutte le varietà osservate, seppure con diversa intensità e diffusione in campo. Sintomi sempre marcati, associati spesso a elevate percentuali di diffusione, sono stati riscontrati sulla varietà Chardonnay in tutti gli areali di coltivazione monitorati. Per questa varietà, in alcuni vigneti, si è registrato fino al 30% di piante con sintomi. Sempre sporadici sono risultati, invece, i sintomi sulle altre varietà a diffusione internazionale monitorate (Pinot grigio, Pinot nero, Merlot, Cabernet S., Syrah).

Come già osservato in precedenti attività di monitoraggio svolte dal Ser-

vizio fitosanitario regionale, sintomi ascrivibili a giallumi della vite sono stati rilevati sulle varietà locali Inzolia, Nero d'Avola e Nerello Mascalese, seppure con percentuali di diffusione in campo generalmente contenute e, in media, comprese fra l'1 e il 5%. Solo in un vigneto di Inzolia, localizzato a Menfi (Agrigento), e in due vigneti di Nerello Mascalese, entrambi situati in provincia di Trapani, sono state rilevate percentuali di piante sintomatiche intorno al 10%.

Per la prima volta sintomi di legno nero sono stati osservati anche sulle cultivar locali Catarratto bianco comune e Grecanico dorato. Nel caso del Catarratto bianco comune, in alcuni vigneti è stato riscontrato fino al 5% di piante sintomatiche, mentre nei due vigneti di Grecanico dorato monitorati tale percentuale è risultata dell'ordine dell'1%.

Da osservare che sia su Catarratto bianco comune sia su Nero d'Avola i vigneti con le più alte percentuali di piante sintomatiche erano sempre localizzati in prossimità di impianti di Chardonnay diffusamente colpiti dal fitoplasma.

Il monitoraggio eseguito sulla flora spontanea ha evidenziato una generalizzata presenza di convolvolo in oltre il 90% dei vigneti ispezionati. La presenza di questa infestante è stata frequentemente riscontrata sia sui bordi

dell'apezzamento sia lungo i filari in quantità spesso elevate. Altre comuni specie infestanti dei vigneti, già segnalate come ospiti del fitoplasma stolbur (*Amaranthus retroflexus*, *Solanum nigrum*), sono state rinvenute in circa il 70% delle aziende visitate ma quasi esclusivamente lungo i bordi dei vigneti o, comunque, in aree limitate. In nessuno degli impianti monitorati è stata segnalata, invece, la presenza di ortica, né lungo i bordi né in prossimità dei filari.

Nessun sintomo riferibile a infezioni da fitoplasmi è stato rilevato sulle specie spontanee sottoposte a osservazione visiva e le analisi molecolari eseguite sui campioni raccolti hanno evidenziato la presenza di infezioni da stolbur solo in piante di *C. arvensis* ma con percentuali sempre molto basse (11,1%). La caratterizzazione molecolare del fitoplasma eseguita sul gene *tuf* ha consentito, infine, di riferire tutte le infezioni riscontrate sui campioni di vite e su *C. arvensis* al ceppo «tuf-tipo b».

Continuare con il monitoraggio e misure preventive

L'attività di monitoraggio eseguita nel quadriennio 2008-2012 ha permesso l'osservazione di realtà viticole siciliane caratterizzate da situazioni pedoclimatiche e agronomiche differenti e di seguire l'andamento delle infezioni da legno nero nel corso di diverse stagioni vegetative consentendo, quindi, di delineare un quadro sulla presenza, diffusione ed evoluzione nel tempo della malattia nella Sicilia occidentale.

L'indagine ha evidenziato l'assenza di flavescenza dorata in tutti i vigneti in cui sono stati osservati sintomi da fitoplasmi, indipendentemente dalla provenienza (regionale/extraregionale) del materiale di propagazione costitutivo, confermando quanto già osservato in Sicilia in precedenti indagini (La Rosa et al., 2006; 2008).

A eccezione di gravi ed estese infezioni di legno nero riscontrate in diversi vigneti a carico della cv Chardonnay, che conferma anche in questi areali un'elevata suscettibilità alla malattia, **la presenza di legno nero nelle aree monitorate non manifesta un andamento di tipo epidemico, mantenendosi a un livello generalmente basso sia su varietà internazionali sia su varietà tipicamente autoctone.**

Suscettibilità delle cultivar

Con particolare riferimento al panorama varietale locale e sulla base anche di pregresse osservazioni effettuate dal Servizio fitosanitario, la cv Inzolia risulta la varietà con la maggiore frequenza di campi sintomatici e con le più elevate percentuali di infezione. Di particolare rilievo risulta il rinvenimento di piante sintomatiche e infette appartenenti alle cultivar Catarratto bianco comune e Grecanico dorato, sulle quali non era mai stata segnalata la presenza di sintomi di fitoplasmosi in precedenti attività di monitoraggio, che evidenzia anche per queste varietà, di rilevante importanza per la viticoltura regionale, una suscettibilità alle infezioni di legno nero.

Un certo rilievo assume anche il dato relativo alla presenza di percentuali più elevate di piante sintomatiche in vigneti di varietà autoctone situati nelle immediate vicinanze di impianti di Chardonnay fortemente colpiti da GY, che pone in evidenza il potenziale rischio che la coltivazione di varietà ad ampia diffusione e particolarmente suscettibili alle infezioni da fitoplasmi potrebbe rappresentare per lo stato sanitario del germoplasma viticolo locale. Per la salvaguardia di tale germoplasma potrebbe, quindi, essere opportuno evitare la realizzazione di nuovi impianti nelle immediate vicinanze di vigneti costituiti con varietà suscettibili a legno nero e già interessati dalla malattia.

Importante gestire la flora spontanea

Da un punto di vista epidemiologico lo stolbur «tuf-tipo b» (ciclo biologico su convolvolo) si conferma il solo ceppo presente sul territorio, come già precedentemente riportato per altri areali viticoli siciliani (Pacífico et al., 2005; La Rosa et al., 2006 e 2008). L'assenza anche in vigneti realizzati con barbatelle di provenienza extraregionale della variante molecolare «tuf-tipo a», esclusiva degli areali viticoli del Centro-nord Italia e spesso prevalente rispetto al «tuf-tipo b», rende più probabile l'ipotesi di un'origine locale delle infezioni di legno nero riscontrate. Sulla base delle attuali conoscenze sul ciclo epidemiologico di legno nero, tale ipotesi troverebbe sup-

porto anche nella generalizzata assenza di ortica – ospite specifico di stolbur «tuf-tipo a» – e con la diffusa e abbondante presenza di convolvolo – specie ospite del solo stolbur «tuf-tipo b» – rilevata nella maggioranza dei vigneti monitorati. La positività a quest'ultimo ceppo riscontrata in alcuni campioni di *C. arvensis* provenienti da vigneti infetti conferma, allo stesso tempo, il potenziale ruolo che questa specie spontanea può svolgere come sorgente del fitoplasma negli areali considerati.

Anche se al momento il legno nero non costituisce un'emergenza fitosanitaria nei comprensori viticoli considerati, alla luce di quanto osservato in campo appare quanto mai importante un'attività di monitoraggio e l'adozione di adeguate misure di prevenzione per evitare che vengano compromessi areali attualmente esenti dalla malattia o caratterizzati da basse percentuali di infezione. In tal senso, una gestione razionale della flora spontanea con interventi di diserbo o lavorazioni nel periodo autunnale e soprattutto primaverile appare sicuramente consigliabile per ridurre i rischi di introduzione e diffusione del legno nero all'interno dei vigneti.

Luca Ferretti

Andrea Gentili, Graziella Pasquini

*Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura
Centro di ricerca per la patologia vegetale
Roma*

Giuseppe Bono

Servizio fitosanitario Regione Siciliana

V Per commenti all'articolo, chiarimenti o suggerimenti scrivi a: redazione@informatoreagrario.it

Per consultare gli approfondimenti e/o la bibliografia: www.informatoreagrario.it/rdLia/13ia45_7267_web

ALTRI ARTICOLI SULL'ARGOMENTO

- *Viti risanate dal legno nero con la capitozzatura.* Pubblicato su *L'Informatore Agrario* n. 30/2011 a pag. 60.
- *Quale flora spontanea controllare per ridurre le infezioni da stolbur.* Pubblicato su *L'Informatore Agrario* n. 41/2009 a pag. 13.

www.informatoreagrario.it/bdo

In Sicilia il legno nero della vite deve essere monitorato

BIBLIOGRAFIA

Bagnoli B., Ferretti L., Trivellane V., Nuccitelli L., Pasquini G. (2008) - Accertamento della presenza di *Scaphoideus titanus* nel Lazio. *Petria*, 18 (2): 304-308.

Belli G., Bianco P.A., Conti M. (2010) - Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 303-326.

Borgo M., Albanese G., Quaglino F., Casati P., Ermacora P., Ferretti L., Ferrini F., Filippin L., Pasquini G., Angelini E. (2008) - Ruolo di altre piante nell'epidemiologia dei fitoplasmi agenti di *flavescenza dorata* e legno nero. *Petria*, 18: 261-263.

Credi R., Terlizzi F., Milanesi L., Bondavalli R., Cavallini G., Montermini A., Dradi D. (2006) - Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyaesthes obsoletus*, at sites of grapevine bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. *Acta 15th Meeting of the international council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine*, Stellenbosch, South Africa: 182-183.

Deng S., Hiruki C. (1991) - Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.

Granata G. (1982) - Deperimenti e giallumi in piante di vite. *Informatore Fitopatologico*, 7-8: 18-20.

Granata G. (1985) - Epidemic yellows in vineyards of cv Inzolia in Sicily. *Phytopathologia Mediterranea*, 24: 79-81.

Griffo R., Benchi D., Bifulco A., Pesapane G. (2011) - *Flavescenza dorata* anche in Campania. *L'Informatore Agrario*, 44: 67.

La Rosa R., Rapisarda C., Cavalieri V., Pacifico D., Tessitori M. (2008) - Monitoraggio ed epidemiologia dei giallumi della vite in Sicilia. *Petria*, 18: 281-283.

La Rosa R., Tessitori M., Reina A., Tamburino V., Bono G., Raciti E. (2006) - Indagini sui giallumi della vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, 4: 44-49.

Langer M., Maixner M. (2004) - Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non ribosomal DNA. *Vitis*, 43: 191-200.

Lee I.M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E. (1994) - Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566.

Marzachì C., Alma A., d'Aquilio M., Minuto G., Boccardo G. (1999) - Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *Journal of Plant Pathology*, 81 (2): 127-136.

Milanesi L., Bondavalli R., Mori N., Dradi D., Menozzi I., Bertaccini A. (2005) - Osservazioni sul vettore del fitoplasma del legno nero della vite, *Hyaesthes obsoletus*, in Emilia-Romagna. *Petria*, 15: 59-61.

Pacifico D., Alma A., Tessitori M., Marzachì C. (2005) - Caratterizzazione di fitoplasmi associati al legno nero (LN) della vite in Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia e Valle d'Aosta. *Petria*, 15: 113-115.

Pasquini G., Albanese G., Angelini E., Bertaccini A., Bianco P.A., Borgo M., Carraro L., Casati P., Durante G., Ferretti L., Gentili A., Marzachì C., La Ro-

sa R., Pacifico D., Paltrinieri S., Zorloni A. (2008) - Caratterizzazione molecolare del fitoplasma agente di legno nero. *Petria*, 18: 250-253.

Pasquini G., Ferretti L., Albanese G., Bagnoli B., Pinzauti F., Barba M. (2006) - Geographical distribution of stolbur isolates in vineyards of Central and Southern Italy. *Extended Abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosch*: 103-104.

Romanazzi G., D'Ascenzo D., Murolo S. (2009) - *Tussilago farfara*: a new natural host of stolbur phytoplasma. *Plant Pathology*, 58 (2): 392.

Romanazzi G., Murolo S., D'Ascenzo D., Di Giovanni R. (2007) - Nuove acquisizioni sulla diffusione dei giallumi della vite in Abruzzo. *Italus Hortus*, 14: 253-256.

Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C. (1995) - Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. 1: 369-380.

Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E. (1997) - Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381-3389.

Sillettì M.R., Murolo S., Romanazzi G., Savino V. (2008) - Caratterizzazione molecolare di isolati pugliesi di legno nero della vite. *Petria*, 18: 287-289.

Viggiani G. (2002) - Il vettore della *flavescenza dorata* trovato in Basilicata. *L'Informatore Agrario*, 36: 59.

Viggiani G. (2004) - Il vettore della *flavescenza dorata* anche in Campania. *L'Informatore Agrario*, 18: 98.

DIAGNOSI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI FITOPLASMI NEI CAMPIONI RACCOLTI

Per l'identificazione specifica di fitoplasmi, tutti i campioni di vite e piante spontanee raccolti sono stati sottoposti a estrazione del DNA totale a partire da 1 g di nervature fogliari polverizzate in azoto liquido seguendo il protocollo descritto in Marzachi *et al.* (1999). Il DNA estratto da ciascun campione è stato, quindi, sottoposto a doppia amplificazione genica utilizzando la coppia di oligonucleotidi universali P1/P7 (Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) in PCR (Polymerase Chain Reaction) diretta seguita da due distinte PCR nested effettuate, rispettivamente, con le coppie di oligonucleotidi R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994), specifica per i gruppi ribosomici 16SrI (Aster yellows) e 16SrXII (Stolbur) e R16(V)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994), specifica per i fitoplasmi del gruppo 16SrV (Elm yellows), a cui appartengono i fitoplasmi agenti di FD.

I prodotti di amplificazione ottenuti in PCR nested con gli oligonucleotidi R16(I)F1/R1 sono stati, quindi, sotto-

posti ad analisi del profilo dei frammenti di restrizione (RFLP) previa digestione enzimatica con l'enzima *MseI* (Biolabs) per la differenziazione del fitoplasma stolbur (16SrXII-A) da quelli appartenenti al gruppo 16SrI.

Per la determinazione del «tipo-tuf», tutti i campioni di vite e piante spontanee risultati positivi per la presenza di stolbur sono stati caratterizzati molecularmente secondo il protocollo descritto in Langer e Maixner (2004).

A tal fine il DNA totale dei campioni infetti è stato sottoposto a doppia amplificazione genica utilizzando le coppie di oligonucleotidi fTufAY/rTufAY (Schneider *et al.*, 1997) e TufAYf2/TufAYr2 (Pasquini *et al.*, 2006), specifiche per il gene *tuf*. Per la distinzione dei «tipi-tuf» di stolbur, gli ampliconi ottenuti dalla seconda amplificazione sono stati sottoposti ad analisi RFLP dopo digestione con l'enzima di restrizione *HpaII* (Biolabs). ●

TABELLA A - Origine geografica delle aziende monitorate e varietà osservate in ciascuna azienda

Provincia	Località	Cultivar (*)	Provincia	Località	Cultivar (*)
Agrigento	Sambuca di Sicilia	Chardonnay	Trapani	Marsala	Inzolia
	Montevago	Chardonnay, Inzolia		Marsala	Inzolia
	Menfi	Chardonnay		Partanna	Inzolia grecanico
	Menfi	Inzolia		Santa Ninfa	Chardonnay
	Menfi	Merlot, Pinot grigio		Mazara del Vallo	V. berlandieri x rupestris 140 Ruggeri
	Menfi	Pinot grigio		Poggioreale	Catarratto
Palermo	Roccamena	Chardonnay		Vita	Inzolia
	Cerda	Chardonnay, Inzolia		Vita	Chardonnay
	Ciminna	Chardonnay, Cabernet S.		Castelvetrano	Catarratto
	Mezzoiuso	Chardonnay		Mazara del Vallo	1103 Paulsen
	Monreale	Chardonnay, Catarratto		Santa Ninfa	Chardonnay
	Monreale	Chardonnay		Santa Ninfa	Chardonnay
	P. degli Albanesi	Catarratto, Syrah, Chardonnay		Partanna	Inzolia
	Monreale	Chardonnay		Partanna	Nero d'Avola
	Partinico	Catarratto		Partanna	Chardonnay
	Monreale	Nero d'Avola		Trapani	Inzolia
	Monreale	Nero d'Avola	Trapani	Nerello Mascalese	
	Sancipirello	Chardonnay, Pinot nero	Trapani	Nerello Mascalese	
	Monreale	Chardonnay			

(*) In rosso le cultivar risultate sintomatiche e infette.